Lane Medical Library
JUL 1 1939 LIBRARY

Aus der Medizinischen Universitätsklinik zu Kiel
Direktor: Prof. Dr. H. Löhr

Nachuntersuchungen über die Mikromethode zur Bestimmung des Harnstoffes im Urin u. Blut von Levinson

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrecht-Universität in Kiel

vorgelegt von
Erhard Fritsche
aus Konitz

Kiel 1938

Druck: Lengericher Handelsdruckerei, Lengerich i. W.

Nr. 155

Rektoratsjahr 1937/38

1. Berichterstatter: Dozent Dr. med. Chrometzka
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Netter

Zum Druck genehmigt:
Prof. Dr. Löhr, Dekan.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkei gewidmet!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153718_0213

Zur Bestimmung von Harnstoff im Urin und Blut bestehen 3 Methoden:

1. Die Ureasemethode
2. Die Xanthydrolmethode
3. Das Hypobromitverfahren.

Die beiden ersten Methoden sind exakt, aber für laufende klinische Untersuchungen etwas umständlich. Im Jahre 1935 wurde nun eine Mikromethode zur Bestimmung des Harnstoffes im Urin und Blut von Levinson angegeben, die auf dem Hypobromitprinzip aufgebaut war und den Vorteil der Einfachheit zu haben schien. Der Verfasser gibt an, daß die Methode auch genau sei, und die Fehlergrenze des Verfahrens nicht 5 % überschreite.

Das Verfahren, im Prinzip kurz zusamengefaßt, ist folgendes:

Das Verfahren beruht auf der üblichen Zersetzung des Harnstoffes mit Natriumhypobromit, wobei aber nicht der entstehende Stickstoff gemessen, sondern der Hypobromitverbrauch bestimmt wird. Titration des Ueberschusses nach Zugabe von Kaliumjodid mit Natriumthiosulfat. Folgende Lösungen werden als Reagenzien gebraucht:

0,1 n-NaOBr, 1 n-Salzsäure. 5 proz. Kaliumjodid- und 1-proz. Stärkelösung. Der zu untersuchende Urin ist mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 zu verdünnen, worauf 1—5 ccm in einem Kolben von 10—25 ccm Inhalt mit 2—3 ccm NaOBr-Lösung versetzt werden. Gleichzeitig ist der Titer der Hypobromitlösung zu bestimmen, indem eine gleiche Menge zu 1—5 ccm Wasser gegeben wird. Beide Proben sind während 15 Minuten zu verschließen und dann mit 0,5 bis 1 ccm 1 n-Salzsäure, 10 Tropfen Kaliumjodid- und 1—2 Tropfen Stärkelösung zu versetzen. Anschließende Titration des ausgeschiedenen Jods mit Thiosulfat. Die Berechnung des Harnstoffgehaltes erfolgt auf Grund des Thiosulfatverbrauchs nach Abzug des Blindwertes. Zur Harnstoffbestimmung im Blute wird nach Hagedorn-Jensen enteiweißt. In 2 Reagenzgläser gibt man je 5 ccm 0,45 % Zinksulfatlösung,

1 ccm 0,1 n-NaOH und in das eine Glas 0,1 ccm Blut. Enteiweißung im siedenden Wasserbad während 3—5 Minuten. Filtration durch Watte und sorgfältiges Auswaschen mit heißem, destilliertem Wasser. Zugabe von 1—2 ccm Hypobromit, wobei im übrigen wie bei der Bestimmung im Urin verfahren wird. Die NaOBr- und Thiosulfatlösung sind 0,1 bzw. 0,01 normal. Die Fehlergrenze der Methode überschreitet 5 % nicht, sie ist einfach und rasch ausführbar. Ammoniak, Kreatinin und Aminosäuren werden gleichzeitig mit dem Harnstoff zersetzt und ergeben auch einen Hypobromitverbrauch.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, den Wert dieser Methode zu prüfen und festzustellen, ob das Verfahren klinisch verwendbar ist.

Die Untersuchungen gliedern sich in folgende Abschnitte:

1. Prüfung des Verfahrens mit reinen Harnstofflösungen.
2. Harnstoffanalysen im normalen Harn; Vergleichsbestimmungen mit der Xanthydrolmethode.
3. Harnstoffanalysen im Blut.

1. Prüfung des Verfahrens mit reinen Harnstofflösungen.

Zu den Versuchen nahm ich als Stammlösung eine n/10-Harnstofflösung, die jeden Tag frisch zubereitet wurde.

Folgende Versuchsanordnung wurde gewählt:

In je zwei Erlenmeyerkolben mit eingeschliffenem Stopfen von 25 ccm wurden je 1 ccm 1 : 10 verdünnte n/10-Harnstofflösung und in einem anderen Kolben 1 ccm destilliertes Wasser als Kontrolle getan. Zu allen drei Gefäßen setzte ich 3 ccm der angefertigten n/10-Hypobromitlösung. Die drei Kolben werden jetzt verschlossen und für 10—15 Minuten im Dunklen stehen gelassen; danach wurde jeder Kolben mit 1 ccm n-Salzsäure, 10 Tropfen 5 % Jodkali- und drei Tropfen 1%iger Stärkelösung versetzt. Es folgt jetzt die Titration mit n/10 Thiosulfatlösung, wobei 1 ccm Thiosulfat 1 mg Harnstoff entspricht. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und den beiden Ansätzen, deren Ergebnis erst zusammengezählt und dann durch zwei geteilt werden, ergibt die Gewichtsmenge Harnstoff.

Hiermit erhielt ich folgende Werte:

Tabelle I

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,08
2. 0,10	0,10
3. 0,10	0,12

In einer neuen Versuchsreihe wurde die Harnstofflösung in folgenden Konzentrationen genommen:

1. 1 ccm 1 : 10 n/10 Harnstofflösung
2. 2 ccm 1 : 10 n/10 Harnstofflösung
3. 1 ccm unverdünnte n/10 Harnstofflösung.

Ich erhielt folgende Werte:

Tabelle II

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,09
2. 0,20	0,14
3. 1,00	1,01

Bei der nächsten Versuchsreihe machte ich noch einen vierten Ansatz mit 2 ccm unverdünnter n/10 Harnstofflösung. Zu diesem Ansatz setzte ich 5 ccm Hypobromitlösung. Die anderen Reagenzien wurden in derselben Menge hinzugesetzt. Ich erhielt folgende Werte:

Tabelle III

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,09
2. 0,20	0,17
3. 1,00	0,33
4. 2,00	1,27

Bei der nächsten Versuchsreihe wurden auch bei dem Ansatz mit 2 ccm unverdünnter n/10 Harnstofflösung nur 3 ccm Hypobromitlösung hinzugesetzt. Ich erhielt folgende Werte:

Tabelle IV

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	——
2. 0,20	0,06
3. 1,00	0,72
4. 2,00	1,49

Die bisherigen Ergebnisse zeigen wechselnd gute, zum größten Teil aber schlechte Resultate. In dieser Form war also die Methode nicht brauchbar. Auf der Suche nach etwaigen Fehlerquellen glaubte ich, daß vielleicht das destillierte Wasser, das ich für die vielen Verdünnungen benutzte, nicht einwandfrei war. Ich habe deswegeen zu den nächsten Ansätzen redestilliertes Wasser benutzt. In den nachfolgenden Ansätzen wurden folgende Werte erhalten:

Tabelle V

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,09
2. 0,20	0,18
3. 1,00	0,91
4. 2,00	1,63

Tabelle VI

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,10
2. 0,20	0,23
3. 1,00	0,84
4. 2,00	1,55

Auch jetzt sind die Werte untereinander zu divergent, um befriedigen zu können, insbesondere der höheren Konzentrationen der Harnstofflösungen, es wurde deswegen folgende Versuchsanordnung gewählt:

1. 1 ccm 1 : 10 n/10 Harnstofflösung + 3 ccm Hypobromit
2. 2 ccm 1 : 10 n/10 Harnstofflösung + 3 ccm Hypobromit
3. 1 ccm unverdünnte n/10 Harnstofflösung + 5 ccm Hypobromit
4. 2 ccm unverdünnte n/10 Harnstofflösung + 5 ccm Hypobromit

Ich erhielt folgendes Ergebnis:

Tabelle VII

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,21
2. 0,20	0,19
3. 1,00	0,27
4. 2,00	0,62

Gegenüber den vorhergehenden Versuchsreihen, die nur in den höheren Harnstoffkonzentrationsansätzen einen erheblichen Unterschied zwischen dem theoretischen Wert und der erhaltenen Ausbeute aufwiesen, war in der letzten Versuchsreihe der erhaltene Harnstoffgehalt derart gering, daß der Gedanke nahe lag, daß die Hypobromitlösung unbrauchbar geworden war. Deshalb wurden jetzt 2 Versuchsreihen angesetzt a) mit der alten Hypobromitlösung und b) mit einer neu zubereiteten Hypobromitlösung. Die Versuche wurden so angesetzt, wie der letzte, nur mit dem Unterschied, daß n u r bei dem Ansatz mit 2 ccm unverdünnter n/10 Harnstofflösung 5 ccm Hypobromitlösung hinzugesetzt wurden. Zu den anderen 3 Versuchen wurden 3 ccm Hypobromitlösung genommen. Folgendes Ergebnis:

Tabelle VIII

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	a) 0,08
	b) 0,11
2. 0,20	a) 0,06
	b) 0,16
3. 1,00	a) 0,79
	b) 0,91
4. 2,00	a) 1,34
	b) 1,45

In der Tat zeigt sich also, daß die Harnstoffausbeute steigt, wenn man ganz frische Hypobromitlösungen verwendet, trotzdem weicht bei höheren Konzentrationen Harnstoff der erhaltene Wert um fast 30 % vom theoretischen ab. Es muß also die Menge des Hypobromits unzureichend sein. Aus diesem Grunde erhöhte ich dieselbe in den Ansätzen 3 und 4 von 3 auf 5 ccm der Hypobromitlösung und hatte folgende Ergebnisse:

Tabelle IX

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 0,10	0,07
2. 0,20	0,13
3. 1,00	0,36
4. 2,00	0,47

Das Ergebnis dieses Mehrzusatzes von Hypobromit ist vielleicht noch ungünstiger als in den Ansätzen mit 3 ccm Hypobromit. Um das noch einmal zu prüfen, wurde ein und dieselbe Harnstofflösung vergleichsweise mit 3 und 5 ccm

Hypobromitlösung angesetzt, wobei die Versuche 1. I und 2. I die Ansätze sind, zu denen ich 3 ccm und 1. II und 2. II die Ansätze sind, zu denen ich 5 ccm Hypobromitlösung hinzusetzte.

Tabelle X

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. I 1,00	0,78
1. II 1,00	0,37
2. I 2,00	1,50
2. II 2,00	0,70

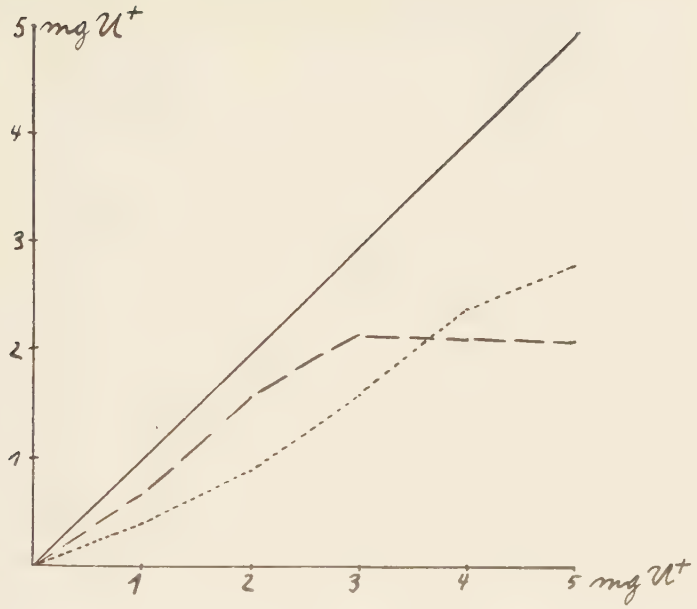
Diese Ergebnisse sind so merkwürdig und unverständlich, daß ich zur Prüfung der unklaren Verhältnisse folgende Versuchsreihe ansetzte:

Zu steigenden Mengen Harnstoff (1—5 mg) wurden pro Ansatz 3 und 5 ccm Hypobromitlösung zugesetzt, dabei blieb die Flüssigkeitsmenge in allen Ansätzen konstant. Das Ergebnis war folgendes:

Tabelle XI

Ansatz mit mg Harnstoff	Ergebnisse mit 3 ccm Hypobromit	Ergebnisse mit 5 ccm Hypobromit
1 mg	0,69	0,41
2 mg	1,58	0,92
3 mg	2,26	1,64
4 mg	2,23	2,43
5 mg	2,20	2,82

Um diese Befunde noch klarer darzustellen, habe ich die Analysenwerte graphisch in der Kurve I aufgezeichnet. Die ausgezogene Linie bedeutet den theoretisch zu erwartenden Wert, die langgestrichelte Linie den mit 3 ccm Hypobromit gefundenen und die kurzgestrichelte Linie den mit 5 ccm Hypobromit erreichten Harnstoffwert.



Dieses Ergebnis stimmt mit den vorhergehenden Ansätzen überein. Der Ansatz mit 3 ccm Hypobromit gibt bessere Resultate als mit 5 ccm Hypobromit. Das gilt für Harnstoffmengen bis 3 mg. Darüber hinaus reagiert das Hypobromit nicht ausgiebiger.

Daraus ist zu ersehen, daß der Reaktionsablauf durch Veränderung, also Vergrößerung, der der Reaktion zur Verfügung gestellten Hypobromitlösung nicht günstiger zu gestalten ist. Das zeigen auch weitere Ansätze mit 5 ccm Hypobromitlösung und steigenden Harnstoffmengen, die ich nur tabellarisch bringe.

Tabelle XII

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 2,00	0,84
2. 4,00	2,27
3. 6,00	2,33
4. 8,00	2,72
5. 10,00	2,72

Tabelle XIII

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Erhaltener Wert in mg Harnstoff
1. 3,00	1,48
2. 6,00	3,65
3. 9,00	3,40
4. 12,00	3,42
5. 15,00	3,59

Daraus ergibt sich, daß die Reaktion mit 5 ccm Hypobromitlösung je nach Konzentration der Harnstofflösung verschieden abläuft: Je höher die Konzentration des Harnstoffes, um so kräftiger der Umsatz; über das der bestimmten Harnstoffkonzentration zukommende Reaktionsmaximum aber geht der Umsatz nicht hinaus. Bei Verwendung einer n/5 Harnstofflösung ist das Reaktionsgleichgewicht schon im Ansatz 2 praktisch erreicht; bei Verwendung der n/3 Harnstofflösung ebenso schon bei Ansatz 2, der Umsatz aber ist entsprechend der größeren Harnstoffkonzentration erheblich höher.

Aus diesen Befunden ergibt sich, daß die Methode keine praktische Bedeutung haben kann, da ja die Harnstoffkonzentration im Harn außerordentlich schwankend ist.

———

2. Harnstoffanalysen im normalen Harn:

Vergleichsbestimmungen mit der Xanthydrolmethode.

Versuchsanordnung:

Sowohl für die Hypobromitmethode wie für die Xanthydrolmethode ging ich von einem 1 : 10 verdünnten Urin aus. Die Xanthydrolmethode wurde nach den klassischen Vorschriften von Fosse durchgeführt, und die Xanthydrolharnstoffverbindung zur Wägung gebracht. Zu den Hypobromitansätzen wurden jeweils 3 und 5 ccm der Hypobromitlösung verwandt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind nach steigenden Harnstoffmengen geordnet und ergeben folgende Tabelle.

Tabelle XIV

Ergebnisse der Xanthydrolmethode in mg Harnstoff	Ergebnisse der Hypobromitmethode in mg Harnstoff	
	3 ccm Hypobromit	5 ccm Hypobromit
1. 0,06	0,34	0,10
2. 0,34	0,34	0,19
3. 0,46	0,61	0,22
4. 0,48	0,59	0,18
5. 0,48	0,59	0,57
6. 0,50	0,63	0,40
7. 0,53	0,92	0,37
8. 1,39	1,68	0,98
9. 1,52	1,74	0,78
10. 1,69	2,32	1,52
11. 1,78	1,67	——
12. 2,86	2,35	——

Besprechung der Tabelle: Grundsätzlich sind die Hypobromitwerte bei Verwendung von 3 ccm Hypobromitlösung weit höher als die entsprechenden Harnstoffwerte, die mit der Xanthydrolmethode gefunden wurden und als Bezugswerte ohne weiteres angenommen werden können. Dieses Ergebnis überrascht in keiner Weise, da ja andere Stoffe als Harnstoff, vor allem Ammoniak, Aminosäuren und Kreatinin mitreagieren. Bei den höchsten Harnstoffkonzentrationen reicht dann das Hypobromit nicht mehr aus, sodaß hier die Hypobromitharnstoffwerte niedriger werden als die Xanthydrolharnstoffwerte.

Die Ansätze mit 5 ccm Hypobromit interessieren hier nur deswegen, weil sie eine Bestätigung der im vorangegangenen Kapitel gemachten Erfahrung sind, daß bei Verwendung größerer Hypobromitmengen die Methode völlig versagt.

Um noch einmal ein klares Vergleichsbild der Zweckmäßigkeit der Xanthydrolmethode und der Unzuverlässigkeit des Hypobromitverfahrens nach Levinson zu geben, habe ich verschiedene reine Harnstofflösungen, sowohl nach dem Xanthydrolverfahren wie nach dem Hypobromitverfahren analysiert. Ich habe tabellarisch folgende Werte gefunden.

Tabelle XV

Theoretischer Wert in mg Harnstoff	Xanthydrolwert in mg Harnstoff	Hypobromitwert in mg Harnstoff
I 1,00	0,95	0,87
3,00	2,90	2,36
II 3,00	2,89	1,42
9,00	5,63	3,71

Zur Veranschaulichung der Verhältnisse bringe ich die Ergebnisse auch noch graphisch in der Kurve II. Die ausgezogenen Linien bedeuten den theoretisch zu erwartenden Wert, die langgestrichelten Linien den mit der Xanthydrolmethode gefundenen Wert und die kurzgestrichelten Linien den mit der Hypobromitmethode erreichten Wert.

Man erkennt auf den ersten Blick die Genauigkeit der Xanthydrolwerte und das ungeheuer starke Abweichen der Hypobromitharnstoffwerte. Die Abweichungen werden umso größer, je mehr Harnstoff in der Lösung enthalten ist.

Abschließend kann man zu diesem Kapitel sagen, daß zu der im Kapitel 1 festgestellten Unsicherheit des Hypobromitverfahrens bei reinen Harnstofflösungen ein völlig unübersichtlicher neuer Bestimmungsfehler bei Analysen im Harn ensteht durch eine völlig unkontrollierbare, in ihren Ausmaßen unübersehbare Mitreaktion anderer Substanzen als Harnstoff.

---

3. Harnstoffanalysen im Blut.

Bei den Blutanalysen wird nach Enteiweißung mit frisch gefälltem Zinkhydroxyd (Hagedorn-Jensen) eine 10fach verdünnte Hypobromitlösung verwandt. Die Titration erfolgt mit n/100 Thiosulfat nach Zusatz von 0,1 ccm n/1 HCl, 1 Tropfen der 5proz. Jodkalilösung und 3 Tropfen der 1proz. Stärkelösung.

Ich untersuchte zunächst 4 Blutproben von Gesunden und erhielt folgende Resultate.

Tabelle XVI

0,1 ccm Blut	mg Harnstoff
1	0,053
2	0,057
3	0,057
4	0,061

Von den Blutproben 1 und 3 wurden um die Genauigkeit der Methode zu prüfen, weiterhin 0,1 ccm, 0,2 ccm und 0,5 ccm Blut zur Analyse angestzt. Die Flüssigkeitsmengen wurden genau gleich gehalten, die Enteiweißungsreagenzien entsprechend verändert. Für jeden Ansatz wurde selbstverständlich ein entsprechender Kontrollansatz gemacht. Die Resultate dieses Serienansatzes sind in Tabelle XVII zusammengestellt.

Tabelle XVII

Blut ccm	Theoretischer Wert	Erhaltener Wert
0,1	——	0,044
0,2	0,088	0,050
0,5	0,220	0,110
0,1	——	0,048
0,2	0,096	0,057
0,5	0,240	0,113

Man ersieht daraus, daß genau wie im Harn die Hypobromitreaktion in den Ansätzen mit mehr Blut als 0,1 ccm nicht zu Ende läuft. Es ist deswegen auch nicht zu erwarten, daß bei Reststickstoff- bzw. Harnstofferhöhungen im Blut ein genügend großer Umsatz der vorhandenen Harnstoffmengen mit dem Hypobromit erfolgt.

Dieser Erwartung entsprechend verhielt sich in der Tat folgender Ansatz: Blut einer Urämie, Rest N 189 mg %, zu erwartender Harnstoffwert etwa 200 mg %. Hypobromitansatz bei Verwendung von 0,1 ccm Blut 210 mg % Harnstoff, bei Verwendung von 0,2 ccm Blut 96 mg % Harnstoff.

Ein weiteres Ergebnis bei einem Rest N von 140 mg % bringe ich tabellarisch.

Tabelle XVIII

Blut ccm	Theoretischer Wert	Erhaltener Wert
0,05	150 mg %	158 mg %
0,1	150 mg %	143 mg %
0,2	150 mg %	40,5 mg %

In demselben Sinne fielen auch weitere Analysen von Blut mit normalen Rest N-Werten aus.

Tabelle XIX

Blut ccm	Theoretischer Wert	Erhaltener Wert
0,05	45 mg %	72 mg %
0,1	45 mg %	65 mg %
0,2	45 mg %	31,5 mg %
0,05	63 mg %	128 mg %
0,1	63 mg %	98 mg %
0,2	63 mg %	41 mg %

Aus allen diesen Blutuntersuchungen zeigt sich, daß das, was für die Harnergebnisse mit der Methode gesagt ist, auch für die Blutbestimmung zutrifft; die Reaktion läuft willkürlich und unkontrollierbar bis zu irgendeinem Punkt ab; die erhaltenen Werte sind dementsprechend unbrauchbar.

Zusammenfassend läßt sich danach sagen, daß die Levinson'sche Mikromethode der Harnstoffbestimmung nach dem Hypobromitverfahren sowohl für Harn wie für Blut völlig unbrauchbar ist. Der Reaktionsablauf ist unübersehbar und willkürlich.

Literaturverzeichnis.

Levinson, M.: Micro-méthode pour la détermination de la teneur du sang et des urines en urée. Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 17, 1157—1162 (1935).

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Dr. Löhr, Kiel, meinen Dank für die freundliche Ueberlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung der Versuche in der Kieler Medizinischen Universitätsklinik aussprechen. Außerdem bin ich Herrn Priv.-Dozent Dr. Chrometzka für seine freundliche Anweisung und Unterstützung bei der technischen Durchführung zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf.

Am 17. Juli 1910 wurde ich als Sohn des Stadtmusikdirektors Max Fritsche und seiner Ehefrau Elsa, geb. Schroeder in Konitz in Westpreußen geboren. Im Oktober 1919 verzogen meine Eltern nach Peine, wo ich das Reform-Realgymnasium besuchte und im März 1931 die Reifeprüfung bestand. Anschließend studierte ich Medizin in Kiel, München und wiederum in Kiel, wo ich das medizinische Staatsexamen am 17. Dezember 1936 bestand. Vom 29. Dezember 1936 bis zum 31. August 1937 war ich als Medizinalpraktikant auf der chirurgischen Abteilung des Stadtkrankenhauses Peine tätig. Seit dem 1. September 1937 bin ich an der medizinischen Klinik zu Kiel als Medizinalpraktikant.